

大豆たん白質による老化制御—老化促進モデルマウス (SAM) による実験的研究

EFFECT OF CHRONIC FOOD RESTRICTION AND CHRONIC FEEDING OF SOY PROTEIN ISOLATE ON THE ADVANCE OF SENESCENCE IN THE SENESCENCE ACCELERATED MOUSE (SAM)

河野篤子・梅沢眞樹子・竹田俊男 (京都大学結核胸部疾患研究所 病理学部門)

Atsuko KOHNO, Makiko UMEZAWA and Toshio TAKEDA

Department of Pathology, Chest Disease Research Institute, Kyoto University, Kyoto 606

ABSTRACT

A murine model of accelerated senescence, the Senescence Accelerated Mouse (SAM), consisting of senescence-prone (SAM-P) series and senescence-resistant (SAM-R) series was recently developed in our laboratory. Judging from the ageing characteristics such as changes in grading score with advancing age, life span, ageing dynamics and autopsy findings, the ageing pattern in this model seems to be due to an accelerated senescence rather than to a premature ageing. The present studies were undertaken to observe the effect of quantity and quality of food on advance of senescence using SAM. 1) The effects of chronic restriction on grading score of senescence, deposition of senile amyloid (ASSAM), mean life span and tenth decile were investigated. The grading score of SAM-P/1 was significantly improved in the 40% food restricted group. In SAM-P/1 liver, skin and testis, the severity of amyloid deposition was significantly less in the 40% restricted group. A definite tendency to prolong mean life span and tenth decile was observed in the 40% restricted group. These results suggest that 40% food restriction modulates the advance of senescence in these mice. 2) The effects of soy protein on grading score of senescence, incidence of thymoma and survival were investigated. The experimental groups consisted of soybean group (fed soybean as protein source) and casein group (fed casein as protein source). The grading scores of SAM-R/1, SAM-P/1 and SAM-P/7 were not significantly different between casein and soybean groups. There were no differences in the incidence of thymoma of SAM-P/7 between two groups. A tendency of increased survival was observed in soybean groups of SAM-R/1, SAM-P/1 and SAM-P/7. The detailed studies on the effect of soy protein on the deposition of senile amyloid, mean life span, tenth decile and immunological functions are now under investigation. *Nutr. Sci. Soy Protein, Jpn* 6, 32-37, 1985.

1968年 Jackson Lab. より入手した AKR マウスを兄妹交配により維持していたところ 1973年頃より腹 (litter) により急速に老化を示すものがあるのに気づ

き、老化が著しく進行しているとみられる 5 腹を選びこれに由来する系統を P-1, -2, -3, -4, -5, 対照として同じ AKR に由来し比較的緩徐な老化を示すとみられる

Table 1. Composition of control diet

Components	%
Casein	25.0
DL-Methionine	0.3
Corn starch	34.1
Sucrose	23.4
Cellulose powder	2.0
Soybean oil	9.0
Salt mix ¹	5.0
Vitamin mix ²	1.0
Choline chloride	0.2
Soybean oil plus vitamins ³	0.1

¹Salt mixture provided (in milligrams per 100 g diet): NaCl, 540.440; K₃C₆H₅•H₂O, 1184.444; K₂HPO₄, 386.667; CaHPO₄•2H₂O, 1777.778; CaCO₃, 817.778; MgCO₃, 204.444; FeC₆H₅O₇•3H₂O, 80.000; CuSO₄•5H₂O, 0.889; MnSO₄, 6.222; K₂Al₂(SO₄)₄•24H₂O, 0.444; KI, 0.222; CoCl₂•6H₂O, 0.444; ZnCO₃, 0.222; NaF, 0.004; (6).

²Takeda, PANVITAN Powder, Takeda Chemical Industries, LTD. Osaka, Japan. Vitamin mixture contained the following in milligrams per 100 g diet: thiamin HNO₃, 1.0; riboflavin, 1.5; pyridoxine HCl, 1.0; nicotinic acid, 10.0; calcium pantothenate, 5.0; folic acid, 0.5; cyanocobalamin, 0.001; ascorbic acid, 37.5; dl- α -tocopherol, 1.0; and I. U. per 100 g diet: retinyl palmitate, 2500; ergocalciferol, 200.

³2500 vitamin A I. U./100 g of diet as synthetic ester and 1.0 vitamin E I. U./100 g of diet as α -tocopheryl acetate were added to soybean oil.

3 腹を選び、それに由来する系統を R-1, -2, -3 とした¹⁾。これらマウスの老化度のより客観的な評価法として、行動性、皮膚所見、眼所見、骨格所見等の計 11 項目について肉眼的観察を行い、程度の強弱に応じて 0～4 までの評点をつけその合計を当該個体の老化評点とした。個体の評点を腹毎に平均しさらに各系統毎に平均値を算出して比較した。この結果老化度評点は R 系に比し P 系において高値を示し、生後 6 ヶ月にてすでに有意な差を有する。この傾向は加齢に伴い増強される^{1,2)}。次に集団としての老化特性をみるために、体重成長曲線、生存率曲線、ゴムベルツ函数、平均寿命について検討したところ、P 系にみられる老化特性は正常な成長ののちに急速に発来する老化徴候の出現、死亡率の低下、平均寿命の短縮(約 30%)で、促進老化=accelerated senescence と規定することができる¹⁾。この意味で私達はこの P 系を Senescence Accelerated Mouse (SAM) 老化促進モデルマウスと名づけ SAM-P として現わし、対照である R 系統を SAM-R 系と示すことにした²⁾。また斃死例の病理組織学的観察を行ったところ、SAM-P 系に加齢に伴って

その頻度と重症度が増加する、いわゆる systemic な senile amyloidosis がみられることが判った³⁾。このアミロイド症にみる沈着アミロイドは生化学的、免疫生化学的に全く新しいアミロイドたん白で ASSAM と命名された^{4,5)}。又、SAM-P/3 系には特に高年齢において白内障の発生をみた(生後 16 ヶ月、約 70%)⁶⁾。

今回促進老化を示す SAM-P/1 系および正常老化を示す SAM-R/1 系マウスを用い以下の 2 つの実験を行った。(1)食餌摂取量制限による老化度評点、老化アミロイド沈着程度、平均寿命におよぼす影響をみる実験(実験 1)。(2)たん白質の質的差異の促進老化におよぼす影響をみるためにカゼインおよび大豆たん白質を夫々たん白源とする実験群において、老化度評点、生存率、アミロイド沈着等におよぼす効果を観察する実験(実験 2)。但しこの実験 2 は終了しておらず、今回途中経過の予備的結果を示すにとどまる。

実験方法

実験 1

生後 4 週齢に達した SAM-P/1 系マウスおよび正常老化を示す SAM-R/1 系マウスを 3 群にわけ、以下のべる食餌条件で実験を開始した。(1)対照群: 25% カゼイン食(組成は Table 1 に示す)。SAM-R/1 雄 10 匹、雌 10 匹、SAM-P/1 雄 10 匹、雌 10 匹。(2)80%群: 上記 25% カゼイン食の対照群食餌摂取量の 80% を投与。SAM-R/1 雄 10 匹、雌 10 匹 SAM-P/1 雄 9 匹、雌 10 匹。(3)60%群: 上記 25% カゼイン食の対照群食餌摂取量の 60% を投与。SAM-R/1 雄 9 匹、雌 9 匹 SAM-P/1 雄 8 匹、雌 7 匹。

これらの食餌投与はヒトの食事形態に近づけるため、朝夕各 2 時間の meal feeding 形式で行い、水は自由摂取とした。体重は毎週測定され、老化度の判定は私達の考案した老化度判定基準に従って 2 ヶ月毎に行われた。各マウスの斃死期を確認し、ほぼ全臓器のパラフィン切片が作製され、その HE 染色、コンゴ赤染色標本を用いて病理組織学的観察を行った。老化アミロイドの同定は生後 8～12 ヶ月の期間に死亡したマウスを対象とし、抗 ASSAM 血清を用いた PAP 法により免疫組織学的に行った。老化アミロイド沈着程度は画像解析装置 Kontron Mop-AMO3 を用い、沈着部位の全面積に占める割合で表した。また平均寿命および tenth decile の観察には、老化とは無関係な原因で死亡することが多い生後 6 ヶ月以前の死亡例は除いて行われた。

実験 2

生後 4 週齢に達した SAM-R/1 系、SAM-P/1 系お

Table 2. Composition of diet (%)

Components	Casein	Soybean
Casein	25.0	—
SPI	—	25.0
DL-Methionine	0.3	0.3
Corn starch	34.1	34.1
Sucrose	20.4	20.4
Cellulose powder	5.0	5.0
Soybean oil	9.0	9.0
Salt mix	5.0	5.0
Vitamin mix	1.0	1.0
Choline chloride	0.2	0.2
Soybean oil plus vitamins	0.1	0.1

よび SAM-P/1 系より分離された胸腺腫好発を特徴とする SAM-P/7 系を夫々 2 群、即ちカゼイン食群と大豆たん白食群に分けた。

(1)カゼイン食群：25%カゼイン食（組成は Table 2 に示す）。SAM-R/1 雄 7 匹，雌 4 匹，SAM-P/1 雄 5 匹，雌 4 匹，SAM-P/7 雄 9 匹，雌 9 匹。(2)大豆たん白質食群：25% SPI（フジプロ R，不二製油㈱）食（組成は Table 2 に示す），SAM-R/1 雄 5 匹，雌 5 匹，SAM-P/1 雄 7 匹，雌 5 匹，SAM-P/7 雄 9 匹，雌 10 匹，カゼイン食および大豆たん白質食共にたん白質のみ変化させた等カロリー食である。これら食餌と水はいずれの群も自由摂取とし，体重測定および老化度判定は実験 1 と同様に行われた。マウスの斃死期を確認し，ほぼ全臓器のパラフィン切片を用いて病理組織学的観察が行われた。現在実験が終了していないため平均寿命に対する影響は現時点における生存率を観察し

て推定することにした。

結果と考察

実験 1

SAM-R/1, SAM-P/1 系ともに60%群の体重は80%群および対照群に比して軽く，60%あるいは80%群と対照群との差は雌よりも雄において大であった。60%群の平均体重は雌雄共に20 g を超えなかった。

老化度評点は Fig. 1 に示すように SAM-R/1 系では生後 6 ヶ月までは各実験群の間に差がなかったが生後 8，10 ヶ月にて60%，80%群ともに対照群に比し有意な低値を示した。SAM-P/1 系では生後 4 ヶ月で対照群>80%群>60%群の傾向がみられ，この傾向は生後 6 ヶ月で有意となる。また生後10ヶ月にみる60%群の老化度評点は対照群のほぼ1/2で，同年齢の SAM-R/1 の対照群の値に等しい。

次に肝，脾，皮膚，睪丸の老化アミロイド沈着では肝，皮膚，睪丸で対照群に比し60%群で有意な減少を示した。また Table 3 に示すように SAM-P/1 系で平均寿命，tenth decile とともに60%群で対照群に比し，著しい寿命延長が認められた。SAM-R/1 系でも軽度ながら60%群で同様な傾向がみられた。

以上，老化促進モデルマウスを用いた実験で食餌摂取量の制限が明らかに促進老化に対し抑制的に作用していることが判った⁷⁾。

実験 2

各系統の成長曲線は，両食餌群の間で有意な差を示さなかった。老化度評点は Fig. 2 に示すように，SAM-P/1 系で大豆たん白食群の方がカゼイン食群に比しや

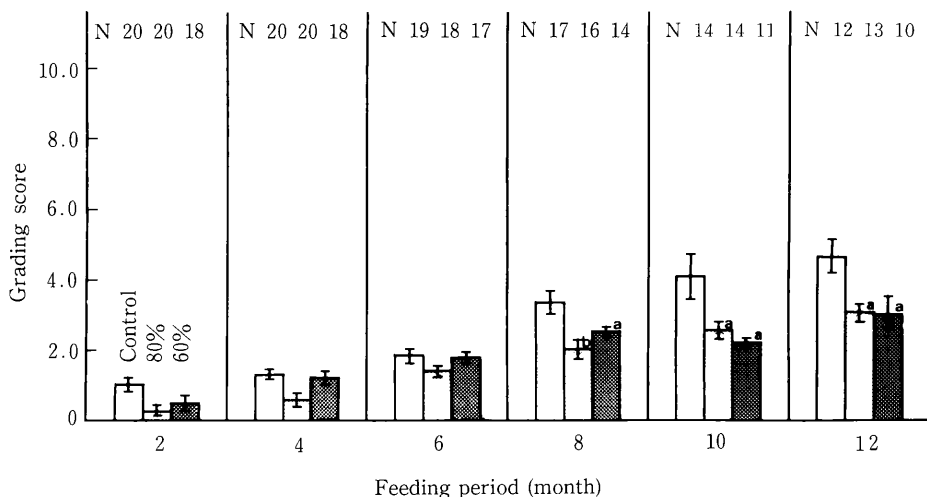


Fig. 1A. Changes in grading score with advancing age in male and female SAM-R/1.

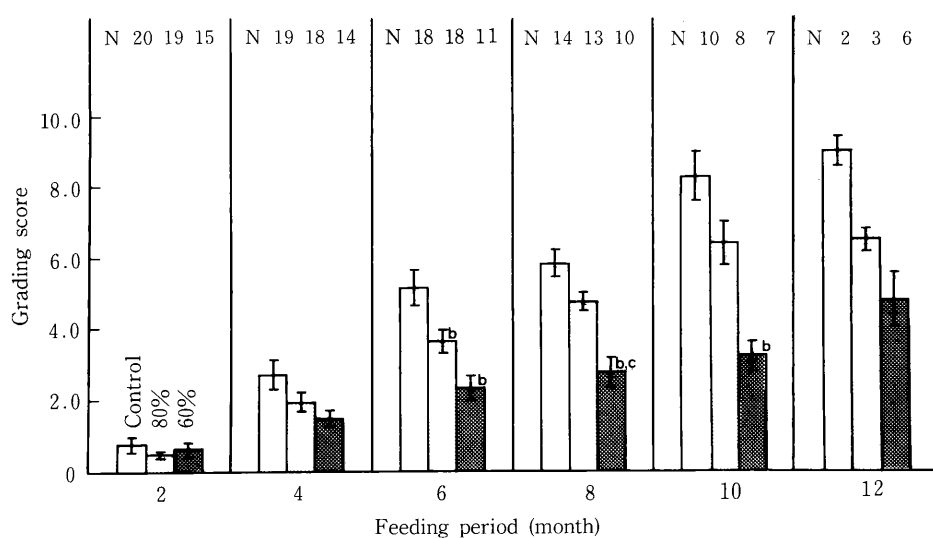


Fig. 1B. Changes in grading score with advancing age in male and female SAM-P/1. Significant differences from corresponding control groups (a: $p < 0.05$, b: $p < 0.01$), and between 80% and 60% fed groups (c: $p < 0.05$). Vertical line represents standard error for each mean value. N: Number of animals examined.

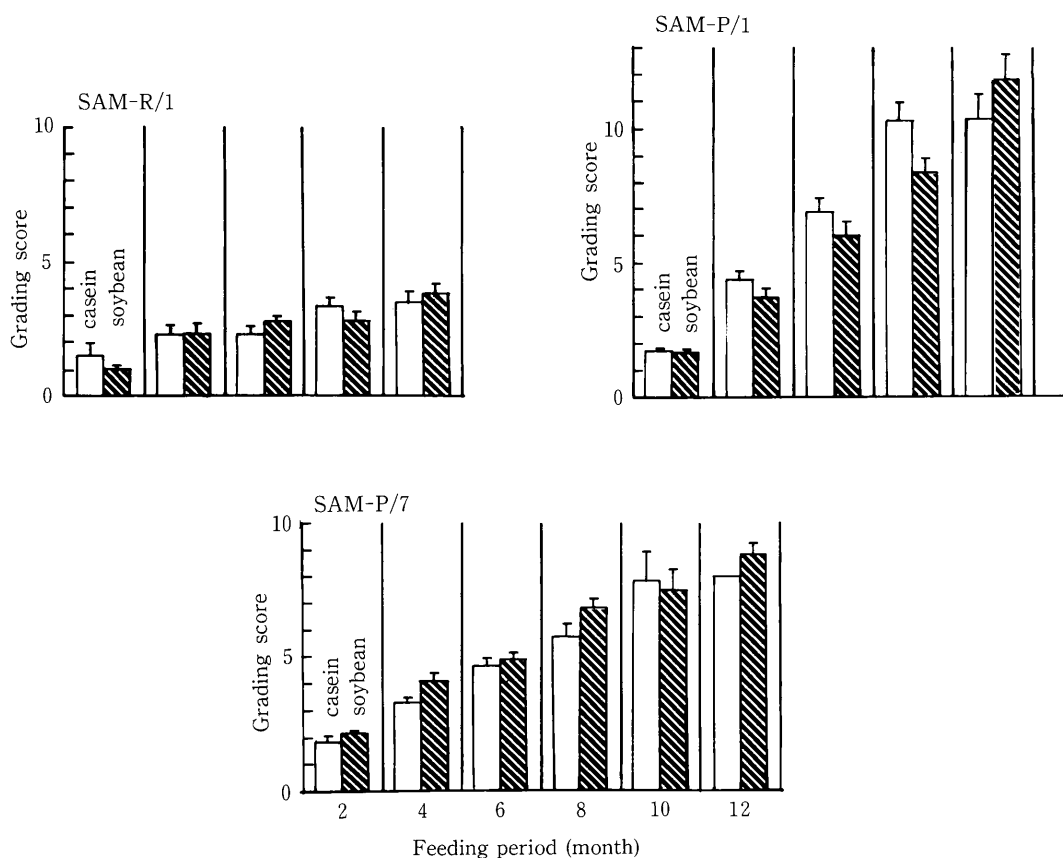


Fig. 2. Changes in grading score with advancing age in male and female SAM-R/1, SAM-P/1 and SAM-P/7. Vertical line represents standard error for each mean value.

Table 3. Mean life span and tenth decile

Strains	Groups	Mean life span	Tenth decile
		days	days
SAM-R/1	Cont	419.7±21.1	668.0± 24.2
	80%	473.9±32.9	645.7± 9.8
	60%	482.7±26.0	744.3± 57.2
SAM-P/1	Cont	318.0±13.8	431.5± 17.5
	80%	342.8±24.5	444.5±109.0
	60%	407.8±24.5**	703.2± 36.0*

* Significant difference between control and 60% fed groups ($p < 0.05$)

** Significant difference between control and 60% fed groups ($p < 0.01$)

や低値を示したが、その差は有意ではなかった。現時点での各実験群の生存率は Table 4 に示す如く、大豆たん白食群の方がカゼイン食群に比し生存率がやや高い傾向を示す (Table 4)。SAM-P/7 系における胸腺腫の発現率については両食餌群間で明瞭な差はみられなかった。

Table 4. Number of survivors at 11 months of age

Strains	Groups	No. of mice at 6m of age	No. of survivors	Survival (%)
SAM-R/1	Soybean	10	9	90.0
	Casein	11	6	54.5
SAM-P/1	Soybean	12	3	25.0
	Casein	9	2	22.2
SAM-P/7	Soybean	19	6	31.6
	Casein	18	2	11.1

Weindruch と Walford らはマウス⁸⁾, Stuchliková らはハムスターとマウス⁹⁾, McCay ら¹⁰⁾, Berg¹¹⁾, Bertrand¹²⁾らはラットを用いて食餌制限による一定の寿命延長を報告している。

今回私達は、私達の教室で開発に成功した促進老化を主徴とする老化促進モデルマウスを用いて食餌摂取量制限が促進老化に対し、改善(抑制)効果があることを確認した。一方この実験の実績に立って、次に食餌中の質的变化の促進老化におよぼす影響をみるため、その手始めとしてたん白質に着目し、カゼインたん白食群と大豆たん白食群を作製し実験を続けた。現在この実験は終了していないので明瞭な結論は得られていないが、上述のように生存率で若干の改善効果が得られていることは、今後の研究の進展に期待を持たせる。今後、これら傾向を確認すると共に、老化アミロイド沈着、あるいは老化度評点に対する影響も例数をふやして詳細に検討を加えたい。

文 献

- 1) Takeda, T., Hosokawa, M., Takeshita, S., Irino, M., Higuchi, K., Matsushita, T., Tomita, Y., Yasuhira, K., Hamamoto, H., Shimizu, K., Ishii, M. and Yamamuro, T. (1981): A new murine model of accelerated senescence. *Mech. Ageing Dev.*, **17**, 183-194.
- 2) Hosokawa, M., Kasai, R., Higuchi, K., Takeshita, S., Shimizu, K., Hamamoto, H., Honma, A., Irino, M., Toda, K., Matsumura, A., Matsushita, M. and Takeda, T. (1984): Grading score system: A method for evaluation of the degree of senescence in Senescence Accelerated Mouse (SAM). *Mech. Ageing Dev.*, **26**, 91-102.
- 3) Takeshita, S., Hosokawa, M., Irino, M., Higuchi, K., Shimizu, K., Yasuhira, K. and Takeda, T. (1982): Spontaneous age-associated amyloidosis in Senescence Accelerated Mouse (SAM). *Mech. Ageing Dev.*, **20**, 13-23.
- 4) Matsumura, A., Higuchi, K., Shimizu, K., Hosokawa, M., Hashimoto, K., Yasuhira, K. and Takeda, T. (1982): Characterization of a novel amyloid fibril protein (AS/SAM) isolated from senescence-accelerated mice. *Lab. Invest.*, **47**, 270-275.
- 5) Higuchi, K., Matsumura, A., Takeshita, S., Hashimoto, K., Hosokawa, M., Yasuhira, K. and Takeda, T. (1983): Systemic amyloid in Senescence Accelerated Mouse (SAM): A unique fibril protein (AS/SAM) demonstrated in tissues from various organs by the unlabeled immunoperoxidase method. *Lab. Invest.*, **48**, 231-240.
- 6) Hosokawa, M., Takeshita, S., Higuchi, K., Shimizu, K., Irino, M., Toda, K., Honma, A., Matsumura, A., Yasuhira, K. and Takeda, T. (1984): Cataract and other ophthalmic lesions in senescence associated ophthalmic changes in mice. *Exp. Eye Res.*, **38**, 105-114.
- 7) Kohno, A., Yonezu, T., Matsushita, M., Irino, M., Higuchi, K., Takeshita, S., Hosokawa, M. and Takeda, T. (1985): Chronic food restriction modulates the advance of senescence in the Senescence Accelerated Mouse (SAM). *J.*

- Nutr.*, **115**, 1259-1266.
- 8) Weindruch, R. and Walford, R. L. (1982): Dietary restriction in mice beginning at 1 year of age: Effect of life-span and spontaneous cancer incidence. *Science*, **215**, 1415-1417.
 - 9) Stuchliková, E., Juricová-Haráková, M. and Deyl, Z. (1975): New aspects of the dietary effect of life prolongation in rodents. What is the role of obesity in ageing?. *Exp. Geront.*, **10**, 141-144.
 - 10) McCay, C. M., Crowell, M. F. and Maynard, L. A. (1935): The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. *J. Nutr.*, **10**, 63-79.
 - 11) Berg, B. N. (1960): Nutrition and longevity in the rat. 1. Food intake in relation to size, health and fertility. *J. Nutr.*, **71**, 242-254.
 - 12) Bertrand, H. A., Lynd, F. T., Masoro, E. J. and Yu, B. P. (1980): Changes in adipose mass and cellularity through the adult life of rats fed ad libitum or a life prolonging restricted diet. *J. Gerontol.*, **35**, 827-835.